

DERWENT-ACC-NO: 2002-733521

DERWENT-WEEK: 200617

COPYRIGHT 2007 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Recombination plasmid and application in
disease prevention and control

INVENTOR: GUO, S; HA, X ; WU, Z

PATENT-ASSIGNEE: INST RADIOMEDICINE MILITARY MEDICAL ACAD[RADIN]

PRIORITY-DATA: 2000CN-0132196 (December 21, 2000)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO		PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC		
CN 1150035	C	May 19, 2004	N/A
000	A61K 048/00		
CN 1358543	A	July 17, 2002	N/A
000	A61K 048/00		

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
CN 1150035C	N/A	2000CN-0132196
December 21, 2000		
CN 1358543A	N/A	2000CN-0132196
December 21, 2000		

INT-CL (IPC): A61K048/00, A61P009/10 , A61P017/00 , A61P017/02 ,
A61P021/00 , A61P025/00 , A61P043/00 , C12N015/09 , C12N015/12 ,
C12N015/85

ABSTRACTED-PUB-NO: CN 1358543A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - The present invention relates to a recombinant plasmid with human hepatocyte growth factor gene and its application for preventing and curing diseases. The human hepatocyte growth factor gene is inserted into pUDK plasmid vector to obtain recombinant plasmid pUDKH. After the recombinant

plasmid is transferred into ischemic region of rat or rabbit member by means of local intramuscular injection or gene gun method.

DETAILED DESCRIPTION - The present invention relates to a recombinant plasmid with human hepatocyte growth factor gene and its application for preventing and curing diseases. The human hepatocyte growth factor gene is inserted into pUDK plasmid vector to obtain recombinant plasmid pUDKH. After the recombinant plasmid is transferred into ischemic region of rat or rabbit member by means of local intramuscular injection or gene gun method, the recombinant plasmid can effectively express and obviously promote vascularization. The recombinant plasmid can be applied to surface of wound of rabbit ear of transferred into wound position by means of gene gun, it possesses the function of preventing and curing scar. The recombinant plasmid possesses good application for preventing and curing ischemic diseases and pathological scar.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: B04 D16

CPI-CODES: B04-E08; B14-N17B; B14-S03A; D05-H12E;

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00132196. X

A61K 48/00

C12N 15/09 C12N 15/12

A61P 9/10 A61P 25/00

A61P 21/00 A61P 17/00

A61P 43/00

[43] 公开日 2002 年 7 月 17 日

[11] 公开号 CN 1358543A

[22] 申请日 2000.12.21 [21] 申请号 00132196. X

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所

地址 100850 北京市太平路 27 号院二所

共同申请人 北京鲁银利华医药科技发展有限公司

[72] 发明人 哈小琴 郭树华 吴祖泽 张庆林
王新国 毕建进 张津辉 李元敏

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图页数 12 页

[54] 发明名称 一种重组质粒及其在疾病防治中的应用

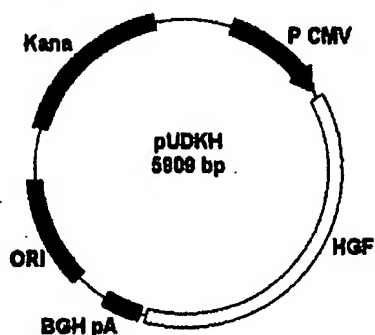
[57] 摘要

本发明涉及生物医学领域,具体的说是涉及一种携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒及其在疾病防治中的应用。将人肝细胞生长因子基因插入到 pUDK 质粒载体中,获得重组质粒 pUDKH。该重组质粒经局部肌肉注射或基因枪方法转移于大鼠和兔肢体缺血部位后,能有效表达并显著促进血管形成。该重组质粒可涂抹于兔耳创口表面或用基因枪方法转至创口部位,有防治疤痕的功效。因此,该重组质粒在缺血性疾病及病理性疤痕的防治中具有极好的应用前景。

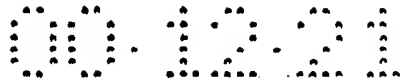
ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种用于治疗缺血性疾病和防治疤痕的重组真核表达质粒，其特征在于该重组质粒携带人肝细胞生长因子基因，含有卡那霉素抗性基因序列；肝细胞生长因子基因受巨细胞病毒启动子、牛生长激素基因的聚腺苷酸信号调控，该重组质粒的结构为：



2. 根据权利要求 1 所述重组质粒的用途，其特征是该重组质粒可以配成注射液、涂液或包裹在金（钨）颗粒、球囊表面，作为防治疾病的药物。
3. 根据权利要求 2 所述重组质粒的用途，其特征是该重组质粒具有促进血管新生和侧枝循环建立的功效，通过局部肌肉注射或基因枪或导管介入转移的方法，用于治疗肢体阻塞性血管病、冠状动脉阻塞性血管病和脑动脉阻塞性血管病。
4. 根据权利要求 2 所述重组质粒的用途，其特征是该重组质粒具有防治缺血性视神经萎缩的功效。
5. 根据权利要求 2 所述重组质粒的用途，其特征是该重组质粒具有防治肌萎缩和肌纤维化的功效。
6. 根据权利要求 2 所述重组质粒的用途，其特征是该重组质粒具有促进伤口愈合、防治疤痕的功效，通过在创口表面、疤痕部位涂抹或注射或基因枪转移该重组质粒的方法达到促进伤口愈合、预防疤痕过度形成和治疗疤痕的目的。
7. 根据权利要求 1 所述的重组质粒，其特征是该重组质粒除携带人肝细胞生长因子基因外，亦可携带其他功能基因，以重组质粒形式用于某些疾病的防治。



说明书

一种重组质粒及其在疾病防治中的应用

本发明涉及生物医学领域，具体的说是涉及携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒及其在缺血性疾病、病理性疤痕防治中的应用。

血管阻塞性疾病包括外周阻塞性血管病、冠状动脉阻塞和脑动脉阻塞，是心脑血管系统中最严重的一类疾病，严重威胁人类健康。目前对该病尚无有效的药物治疗方法，而主要借助于外科手术重建功能动脉，但危险较大，病死率和并发症高，预后很差。因此寻求治疗血管阻塞性疾病的新途径是当前迫切需要解决的问题。基因治疗是近年来兴起的一种新的治疗模式，即通过合适的载体转移有效的促血管生长因子的基因于缺血部位，促进新血管的形成，可在缺血局部形成侧枝循环，建立“分子搭桥”机制。目前，国内外已有用血管内皮生长因子（VEGF）基因治疗血管闭塞性疾病的实验研究，国外已进入 II 期临床研究(Lancet, 1996;348:370)。

疤痕的形成是创伤愈合的产物和象征。然而过度的疤痕增生则是一种病态表现，是创伤外科的一种重要并发症。不仅影响外观，且影响机体功能，疤痕晚期还可发生癌变。目前，人们对疤痕增生后的治疗主要靠手术、加压、冷冻等方法，均不是理想的手段，所以预防疤痕的研究有着极其重要的意义。目前，国内外尚无用生物工程方法制备外用药物预防疤痕的报道。

HGF(专利号 JP 209449/89, JP88592/90, JP200898/90) 是一多功能生长因子，对多种组织细胞的分裂、迁移运动、形态发生起重要的调节作用^[1]。HGF 是一种促血管内皮细胞生长因子，具有促内皮细胞增殖和新生血管生成的作用(J Cell Biol, 1992;119:629)。HGF 除直接作用外，还刺激骨骼肌细胞分泌 VEGF。HGF 还可激活静止的肌卫星细胞，刺激体内骨骼肌的再生，防止肌萎缩和肌纤维化的产生，故 HGF 可促进缺血部位新生血管网的形成，改善肢体的运动功能。另外，HGF 能够明显地抑制转化生长因子（TGF- β ）的产生和增强胶原酶的活性(Nature Med,1999;5:226)，因而能够有效降低组织中 TGF- β 的水平，抑制胶原纤维的过度增生，具有防治纤维化病变的作用。疤痕组织实质是纤维化的肉芽组织，是丰富的胶原沉积伴胶原构型紊乱的结果，也属纤维化病变。

基因治疗用于临床所面临的最大问题就是如何将治疗基因有效地导入靶组织中的细胞，使其以合适的水平表达，达到治疗效果，即如何建立一个安全、高效、实用、可重复的基因转移系统。目前，基因转移方法可大体分为非病毒介导和病毒介导两大类，前者较后者更为安全。裸露质粒 DNA 载体是近年来发展起来的一种新型非病毒载体，正用于基因疫苗和基因治疗的研究。研究证明，将重组质粒直接注射或埋植在骨骼肌、心肌或血管，或涂抹于创口表面，可将外源基因转移至局部组织，并可持续表达出相应蛋白质。据报道，有时一次肌肉注射可以持续表达相应蛋白质 3-6 个月。进入细胞的质粒 DNA，可以不与染色体整合，而在核外胞浆内复制。

鉴于此，我们构建了人肝细胞生长因子的真核表达质粒 pUDKH。局部肌肉注

射裸露质粒 DNA 或将 DNA 包裹在金颗粒上并用基因枪转移至缺血肌肉局部，可明显促进肢体急性缺血部位新血管的形成。另外，将重组质粒直接涂抹于伤口表面，或用基因枪方法转移质粒于伤口，可加速伤口愈合，预防或减小病理性疤痕的形成。具有潜在的临床应用前景。

本发明的第一个目的在于提供一种重组质粒，该重组质粒可携带人肝细胞生长因子基因。

本发明的第二个目的是应用该携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒治疗外周阻塞性血管病。

本发明的第三个目的是应用该携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒治疗冠状动脉阻塞和脑动脉阻塞性疾病。

本发明的第四个目的是应用该携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒防治缺血引起的视神经萎缩。

本发明的第五个目的是应用该携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒防治肌萎缩和肌纤维化。

本发明的第六个目的是应用该携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒防治疤痕的过度形成。

本发明的第七个目的是应用该携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒促进伤口愈合。

本发明的第八个目的在于提供携带除人肝细胞生长因子基因外的其他功能基因的重组质粒，用于某些疾病的防治。

本发明的具体实施方案如下：

1. 携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒 pUDKH 的构建。如图 1：将 pUC18 克隆载体用 Pvu II 酶切，回收 2.3kb 的 DNA 片段。用 Nru I 和 Pvu II 双酶切 pcDNA3，回收 1 kb 的 DNA 片段，该片段含有巨细胞病毒启动子，多克隆位点和生长激素终止子。将这两个片段相连得质粒 pUD (3.3kb)。用 Ava II 和 Ssp I 双酶切 pUD，回收 2.7kb 的 DNA 片段，另用 AvrII 酶切 pEGFP-N1，回收 1.1kb 的 DNA 片段，该片段含有完整的卡那霉素基因；连接两个回收 DNA 片段得质粒 pUDK (3.8kb)。然后将人肝细胞生长因子编码区 cDNA 插入到 pUDK 载体的多克隆位点(BamHI 和 ApaI 两个酶切位点之间)，获得携带人肝细胞生长因子基因的重组载体 pUDKH。

2. 重组质粒的中试规模纯化制备。

质粒纯化制备流程包括：发酵、离心收集细胞、碱变性裂解、分离纯化。发酵后离心所得细菌，加入细胞重悬液，充分混匀。随即缓慢加入裂解液，混匀，置冰浴 10 分钟。缓慢加入中和液，形成白色沉淀物，置冰浴 60 分钟。离心，得到澄清裂解液。用缓冲液平衡分离柱 Ultrapur100(QIAGEN 公司)后，将澄清裂解液上样，然后用另一种缓冲液洗杂质，用特殊缓冲液洗脱重组质粒。向洗脱液中加入 0.7 体积的异丙醇沉淀质粒。所获沉淀用少量 70%乙醇洗涤一次，加入少量去热源水溶解沉淀，透析后即得重组质粒的纯品。琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法确定质粒的纯度和含量。结果显示，超螺旋质粒比例大于 85%，琼脂糖凝胶电泳未见 RNA，分光光度法分析 A_{260nm}/A_{280nm} 在 1.75-1.85 之间。符合质粒的质量控制标准。



3. 观察到该重组质粒能在体外有效地转染原代培养的大鼠骨骼肌细胞。用 pUDK-lacZ 转染原代培养大鼠骨骼肌细胞后，转染效率为 0.057%；并在转染该重组质粒后细胞的分泌上清中检测到了 HGF 的表达(如图 2、图 3)。
4. 观察到该重组质粒能在体外有效地转染 NIH3T3 细胞。用 pUDK-lacZ 转染 NIH3T3 细胞后，转染效率为 7.96%；并在转染该重组质粒后细胞的分泌上清中检测到了 HGF 的表达(如图 4、图 5)。
5. 观察到肝细胞生长因子基因表达产物能显著刺激血管内皮细胞的增殖(如图 6a、图 6b)。
6. 观察到肝细胞生长因子对 NIH3T3 细胞无显著刺激作用(如图 7)。
7. 在大鼠肢体急性缺血模型中，观察到局部转染 pUDK-lacZ 质粒后 β -半乳糖苷酶的表达；并对局部肌肉注射或用基因枪局部转移纯化的重组质粒后，免疫组织化学法检测到肝细胞生长因子在注射局部肌肉组织中的表达；而对照组未见明显的 HGF 表达。
8. 观察到向新西兰兔兔耳疤痕模型创口局部转移 pUDK-lacZ 质粒后 β -半乳糖苷酶的的表达；创口局部转移重组质粒后，免疫组织化学法检测到肝细胞生长因子在转移局部组织中的表达；而对照组未见明显的 HGF 表达。
- 10 观察到大鼠肢体缺血模型转移重组质粒后，大体解剖显示血管密度较未注射质粒的对侧明显增多，H.E. 染色肌肉组织切片中可观察到大量新血管的形成，而且有向大动脉血管发展的迹象；而对照组未见明显的新生血管的形成(如图 8、图 9)。
11. 大鼠肢体缺血模型转移重组质粒后，H.E. 染色肌肉组织切片中未观察到局部肌肉组织的退变或纤维化；而对照组观察到了肌肉组织明显的退变或纤维化现象(如图 10)。
12. 观察到新西兰兔肢体缺血模型注射重组质粒后，H.E. 染色肌肉组织切片中可观察到大量新血管的形成，未观察到局部肌肉组织的退变或纤维化；而对照组未见明显的新生血管的形成，观察到明显的肌纤维变细、断裂，肌肉淤血(如图 11、图 12)。
13. 用新西兰兔通过手术方法建立兔耳疤痕模型，将该重组质粒涂抹于创口表面(预防组)，结果表明预防组较对照组创面愈合快，炎性反应轻，疤痕的形成小；H.E. 染色显示预防组较对照组表皮角化轻、真皮层厚度小，纤维组织薄。从而证实该重组质粒对疤痕形成有一定的预防作用(如图 13)
14. 观察了重组质粒对兔耳创面愈合速度及预防疤痕过度形成的剂量效应关系(见表 1、表 2)。

本发明提供一种携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒，该重组质粒经纯化后可以被冻干保存，可以配成注射液或包裹在金颗粒表面或涂抹液等用于治疗缺血性疾病和促进伤口愈合、预防疤痕形成。缺血性疾病可以是外周梗塞性血管病，也可以是冠状动脉梗塞和脑梗塞性疾病，也可以是缺血性视神经萎缩及其他器官的缺血。伤口可以是皮肤创伤，也可以是皮肤烧伤或手术切口等。实施例将通过描述携带人肝细胞生长因子的重组载体对外周梗塞血管病（肢体缺血）的基因治疗和对皮肤疤痕过度形成的预防作用来进一步阐述本发明。

应用本发明提供的重组载体治疗缺血性疾病和预防疤痕的形成，一是从促进血管形成、建立侧枝循环和改善局部血液循环的目的入手，向患者病变部位组织内导入促血管生成的 HGF 基因。二是从促进血管形成，加速伤口愈合及抑制纤维组织过度形成机制入手，向创口表面涂抹携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒，通过促进血管形成，抑制 TGF β 的产生和增强基质降解酶如胶原酶的活性，来降低组织中 TGF β 的水平和降解胶原纤维，达到促进伤口愈合、预防疤痕过度形成的目的。因此，应用本发明提供的重组质粒，应用简单方便、成本较低。若本发明得以实施，将为目前缺血性疾病的临床治疗提供一种可供选择的新的治疗手段；将是目前尚无有效防治手段的病理性疤痕形成的预防提供一种有效的手段。

结合附图进一步说明本发明：

图 1 pUDKH 的构建图

图 2 pUDK-lacZ 转染原代培养大鼠骨骼肌细胞及其转染效率
(a) x-gal 染色($\times 100$) (b) 转染效率

图 3 原代培养大鼠骨骼肌细胞转染重组质粒后 HGF 的表达

图 4 pUDK-lacZ 转染 NIH3T3 细胞及其转染效率
(a) x-gal 染色($\times 100$) (b) 转染效率

图 5 NIH3T3 细胞转染重组质粒后 HGF 的表达

图 6 肝细胞生长因子基因表达产物对人脐静脉内皮细胞增殖的刺激活性
(a) 对原代人脐静脉内皮细胞的刺激活性
(b) 对人脐静脉内皮细胞系(HUV-EC)的刺激活性
(■未转染质粒上清 □转染质粒上清)

图 7 肝细胞生长因子对 NIH3T3 细胞的作用分析



- 图 8 大鼠后肢急性缺血模型局部转移或不转移重组质粒后，大体解剖观察血管密度
(a)转移侧 (b)未转移侧
- 图 9 大鼠后肢急性缺血模型局部转移或不转移重组质粒后，局部骨骼肌组织切片的显微照片（转移组有大量小新血管形成）(H.E.染色 ×100)
转移组:(a)肌肉注射 (b)基因枪
未转移组:(c) 肌肉注射 (d) 基因枪
- 图 10 大鼠后肢急性缺血模型局部转移或不转移重组质粒后，局部骨骼肌组织切片的显微照片（未转移组肌纤维明显退变）(H.E. 染色 ×100)
(a)转移组 (b)未转移组
- 图 11 兔后肢急性缺血模型局部转移或不转移重组质粒后，局部骨骼肌组织切片的显微照片(转移组有较多新血管形成)(H.E. 染色 ×100)
(a)转移组 (b)未转移组
- 图 12 兔后肢急性缺血模型局部转移或不转移重组质粒后，局部骨骼肌组织切片的显微照片(未转移组肌肉淤血,肌纤维变细、断裂)(H.E. 染色 ×100)
(a)转移组 (b)未转移组
- 图 13 重组质粒预防疤痕形成的组织切片的显微照片(H.E. 染色 ×100)
(a)转移组 (b)未转移组



实施例 1 应用重组质粒 pUDKH 基因治疗大鼠肢体缺血的实验研究

一、重组质粒的构建及制备

(1) 质粒 pUDKH 的构建

构建过程如图 1: 将 pUC18 克隆载体用 Pvu II 酶切, 回收 2.3kb 的 DNA 片段。用 Nru I 和 Pvu II 双酶切 pcDNA3, 回收 1 kb 的 DNA 片段, 该片段含有巨细胞病毒启动子、多克隆位点和生长激素终止子。将这两个片段相连得质粒 pUD (3.3kb)。用 Ava II 和 Ssp I 双酶切 pUD, 回收 2.7kb 的 DNA 片段, 另用 AvrII 酶切 pEGFP-N1, 回收 1.1kb 的 DNA 片段, 该片段含有完整的卡那霉素基因; 连接两个回收 DNA 片段得质粒 pUDK (3.8kb)。然后将人肝细胞生长因子编码区 cDNA 插入到 pUDK 载体的多克隆位点, 获得携带人肝细胞生长因子基因的重组载体 pUDKH。用限制性内切酶鉴定插入是否正确。

(3) 质粒的制备

质粒纯化制备流程包括: 发酵、离心收集细胞、碱变性裂解、分离纯化。发酵后离心所得细菌, 加入细胞重悬液, 充分混匀。随即缓慢加入裂解液, 混匀, 置冰浴 10 分钟。缓慢加入中和液, 形成白色沉淀物, 置冰浴 60 分钟。离心, 得到澄清裂解液。用 350 毫升 缓冲液平衡分离柱 Ultrapure100(QIAGEN 公司)后, 将澄清裂解液上样, 然后用 3.0 升缓冲液洗杂质, 用 400 毫升另一种缓冲液洗脱重组质粒。向洗脱液中加入 0.7 体积的异丙醇沉淀质粒。所获沉淀用少量 70%乙醇洗涤一次, 加入少量去热源水溶解沉淀, 透析后即得重组质粒的纯品。琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法确定质粒的纯度和含量。结果显示, 超螺旋质粒比例大于 85%, 琼脂糖凝胶电泳未见 RNA, 分光光度法分析 A_{260nm}/A_{280nm} 在 1.75-1.85 之间。符合质粒的质量控制标准。

二、骨骼肌细胞的培养及质粒转染

(1) 新生大鼠骨骼肌细胞的原代培养及鉴定

出生两日的大鼠, 全身消毒后剥去一侧后肢皮肤, 取下该后肢置一无菌皿中, 剥离其肌肉于一小瓶中, 用 PBS 充分冲洗, 并尽量剪碎, 加入 0.125%胰蛋白酶消化 3-4 次, 1500 转/分离心 8 分钟, 收集离散细胞, 用骨骼肌细胞饲养液悬浮细胞后, 接种于培养瓶中, 37℃ 孵育。75 分钟后将悬浮细胞移入另一培养瓶中, 以去除易贴壁的非肌细胞成分。用免疫组化方法鉴定是否为骨骼肌细胞, 一抗为鼠抗 desmin 单克隆抗体 (ZEMED), 二抗为生物素标记的抗鼠 IgG, 三抗为辣根过氧化物酶标记的卵白素, 显色系统为 DAB。结果表明 90%以上为骨骼肌细胞。

(2) 质粒 DNA 转染原代骨骼肌细胞

转染采用 Lipofectin 法, 每次转染用 5 微克 DNA + 20 微升脂质体。转染 pUDK-lacZ 后, 测得转染效率为 0.057%; 转染 pUDKH 后 (细胞数为 4×10^5), 在转染换液后 24 小时、48 小时和 72 小时取样, 用 ELISA 法检测 HGF 的表达水平, 一抗为鼠抗人 HGF 单克隆抗体 (R&D)。结果表明, 原代骨骼肌细胞转染 pUDKH 后可在其上清中检测到 HGF 的表达, 表达量约为 16-20ng (如图 2、图 3)。

三、HGF 表达产物对人脐静脉内皮细胞增殖的刺激活性

人脐带内皮细胞原代培养及增殖活性分析: 无菌条件下用 PBS 充分冲洗人脐带腔, 将一端结扎, 从另一端注入 37℃ 预热的 20 毫升 0.125%胰蛋白酶并封闭,

脐带置入 37℃ 预热 PBS 中, 消化 15 分钟, 消化液移入离心管中, 1200 转/分离心 10 分钟, 用含 80% 新生牛血清的 DMEM 重悬细胞, 接种于培养瓶中。

HGF 表达上清对原代人脐静脉内皮细胞和人脐静脉内皮细胞系 (HUV-EC) 的作用分析: 96 孔板每孔所加细胞数为 2500 个, HGF 在原代骨骼肌细胞中的表达上清所加的量分别占培养总体积的 5% (80 皮克), 10% (160 皮克), 15% (240 皮克), 25% (400 皮克) 和 50% (800 皮克)。MTT 法测定细胞增殖活性。结果表明, 上清液具有明显的刺激人脐静脉内皮细胞增殖的活性, 充分证实了 HGF 是血管内皮细胞的强致有丝分裂原 (如图 6a、图 6b)。

四、血管再生评价

(1) 大鼠急性肢体缺血动物模型

雄性大鼠 20 只, 体重 200-250 克。戊巴比妥钠腹腔麻醉 (50 毫克/毫升), 左侧后肢股动脉远段及其主要分支均以细手术丝线结扎后切断, 造成急性后肢缺血性血管病模型, 右侧不予结扎。急性缺血大鼠模型随机分为 2 组, 肌肉注射组和基因枪转移组。

(2) 基因转移

肌肉注射组大鼠于进行手术的同时在结扎部位肌肉直接注射质粒各 200 微克: 5 只模型大鼠注射 pUDKH 质粒, 5 只模型大鼠注射 pUDK 质粒 (对照组)。每只动物注射的液体总量约 0.8 毫升。

基因枪转移组大鼠于术后次日用手提式基因枪 (ST-500, 宁波新芝科器研究所) 转移基因于局部缺血肌肉内。急性下肢缺血性模型大鼠于术后次日麻醉后固定于手术台, 将术侧肢体脱毛。取一定量载体悬液 (包裹质粒的金粉载体) 置于一不锈钢网膜中心, 作为子弹, 待干燥后置基因枪上, 以高压氦气为动力, 基因枪紧贴于皮肤发射 (每个子弹携带约 2.5μ微克 DNA, 氦气压力 25 千帕, 靶面积可达 2 平方厘米), 每只连续发射两次。实验组转移携带 pUDKH (5 只) 的金粉载体, 对照组转移携带 pUDK (5 只) 的金粉载体。

(3) HGF 在骨骼肌组织中的表达

于转移质粒后第 10 天取基因转移部位的肌肉样品, 10% 福尔马林固定后做石蜡切片, 进行免疫组化检测: 一抗为鼠抗人 HGF 单克隆抗体 (R&D), 二抗为生物素标记的羊抗鼠 IgG, 三抗为辣根过氧化物酶标记的亲和素, 显色底物为 DAB 系统。第 10 天时转移 pUDKH 质粒组, 包括基因枪组和肌肉注射组, 肌肉标本均有较强的 HGF 表达。而转移 pUDK 质粒的两组均未见明显的 HGF 表达。

(4) 血管再生分析

于转移质粒后第 10 天, 大体解剖观: 转移携带 HGF 基因质粒的大鼠肢体可见明显的血管增多, 而对侧及转移空质粒的肢体血管未见明显变化 (如图 8)。同时取局部肌肉做横断面石蜡切片, H.E. 染色, 光学显微镜下观察到转移 pUDKH 质粒组, 包括基因枪组和肌肉注射组, 小血管形成明显较转移 pUDK 质粒组增多, 至 30 天时, 血管腔有增大趋势, 且有动脉血管再通迹象 (如图 9)。另外, 在对照组肌肉组织切片中观察到了肌肉组织的退变或纤维化, 而在转移重组质粒组未观察到 (如图 10)。

本实验中采用的大鼠后肢急性缺血的动物模型, 在单纯手术或转移空质粒后 30 天时形成小血管的能力仍很弱。与之相比, 转移 HGF 基因动物组的急性缺血后肢在术后 10 天有大量的新血管生成 (管腔中充满红细胞的为血管), 充分证实了 HGF 的促血管形成作用和基因转移的有效性。

实施例 2 携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒 pUDKH 对疤痕形成的预防作用

一、重组质粒 pUDKH 的构建及大规模纯化制备

同实施例 1

二、重组质粒 DNA 转染 NIH3T3 细胞

质粒 DNA 转染 NIH3T3 细胞采用 lipofectin 法, 每次转染用 5 微克 DNA + 20 微升脂质体。转染 pUDK-lacZ 后, 得其转染效率为 7.96%; 转染 pUDKH 后(细胞数为 1.0×10^6), 在转染换液后 24 小时、48 小时和 72 小时取样, 用 ELISA 法检测 HGF 的表达水平, 一抗为鼠抗人 HGF 单克隆抗体 (R&D)。结果表明, NIH3T3 细胞转染 pUDKH 后可在其上清中检测到 HGF 的表达 (如图 4、图 5)。

HGF 对 NIH3T3 细胞的作用分析: 96 孔细胞培养板每孔接种 2500 个细胞, 用不同浓度的 HGF 蛋白纯品 (5 纳克, 2.5 纳克, 1.25 纳克, 0.5 纳克, 0.25 纳克) (R&D) 刺激 NIH3T3 细胞, MTT 法检测。结果未观察到 HGF 对 NIH3T3 细胞的刺激作用 (见图 7)。

三、预防疤痕的效果评价

1. 疤痕动物模型的建立

新西兰雌性大白兔, 体重 2.5-3.0 公斤。耳腹侧无血管处剃毛消毒后, 以手术方法切除全层皮肤直至软骨表面, 切口的直径约为 0.7 厘米, 每侧 5 个。

2. 效果评价

于切除皮肤的同时将不同剂量的重组质粒 pUDKH 涂抹于创口表面, 每个创口各涂 10 微克, 8 微克, 4 微克, 2 微克, 0 微克, 只涂一次。每个剂量组 2 只兔子, 20 个创口。实验结果表明, 在涂抹后第 8 天愈合速度即有明显差别, 涂 10 微克和 8 微克组均较涂 4 微克、2 微克组和对照组愈合快 (见表 1), 统计学上有显著性差异 ($p < 0.01$); 而 4 微克、2 微克组和对照组比较虽然创口面积缩小但无统计学意义 ($p > 0.05$)。至涂抹后第 30 天, 将创面与邻近无创伤处皮肤一并切下, 10% 福尔马林固定后做石蜡切片, 行 H. E. 染色。光学显微镜观察表明, 涂 pUDKH 组组织切片表皮角化轻, 真皮层厚度小, 纤维组织量少; 而对照组纤维组织多, 真皮层厚 (见图 13)。同时计算每个疤的肥大指数 (Hypertrophic Index, HI) ($HI = \text{疤全层厚} / \text{创口邻近皮肤厚}$), 作为愈合质量的一个指标, 肥大指数与疤痕的大小呈正比。结果显示涂抹 pUDKH 的各组均较对照组肥大指数小, 即疤痕的形成小, 外观较平坦, 但仅涂 10 微克, 8 微克组与对照组比较有显著性差异 ($p < 0.01$, 见表 2)。

同时我们还对涂抹 pUDKH (8 微克) 与涂抹贝复济 (bFGF) (珠海东大生物制药有限公司)、重组人表皮生长因子 (rhEGF) (上海大江股份有限公司生物制药有限公司) 进行了比较。结果初步表明, 涂抹后第 8 天即可观察到涂 pUDKH 组愈合速度稍快 (见表 3)。涂抹后第 25 天, 肥大指数计算涂 pUDKH 组值最小, 与其他组比较有显著差异 ($p < 0.01$, 见表 4)。

表一 不同剂量 pUDKH 对创面愈合的影响

时间 (天)	创口面积 (mm ²)					n
	10 μg	8 μg	4 μg	2 μg	0 μg	
1	40.84±5.32	42.33±2.52	40.13±2.52	41.23±2.75	40.68±2.69	20
8	6.96±7.64	7.67±8.68	15.62±4.96	19.32±4.93	20.02±16.34	20
12	1.00±3.14	4.06±8.23	4.22±5.12	5.26±8.40	5.88±10.80	20

表二 涂抹不同剂量 pUDKH 后各组肥大指数 (HI)

剂量 (μg)	10	8	4	2	0
HI	1.456±0.386	1.236±0.232	1.689±0.358	1.592±0.448	1.896±0.390
n	20	20	20	20	20

表三 重组质粒 pUDKH 及贝复济、rhEGF 对伤口愈合的影响

时间 (天)	创口面积 (mm ²)			
	pUDKH	bFGF	rhEGF	control
1	41.23±2.75	41.78±2.69	40.68±2.69	41.23±2.75
8	19.68±11.6	27.96±13.5	28.90±9.96	28.51±9.74
12	1.276±1.84	3.278±4.59	6.283±9.76	7.504±13.56
n	10	10	10	10

表四 涂抹 pUDKH 及贝复济 (bFGF)、rhEGF 后各组的肥大指数 (HI)

涂抹剂	pUDKH	bFGF	rhEGF	control
HI	1.861±0.53	2.156±0.32	2.255±0.64	2.794±0.58
n	10	10	10	10

00-12-31

说明书附图

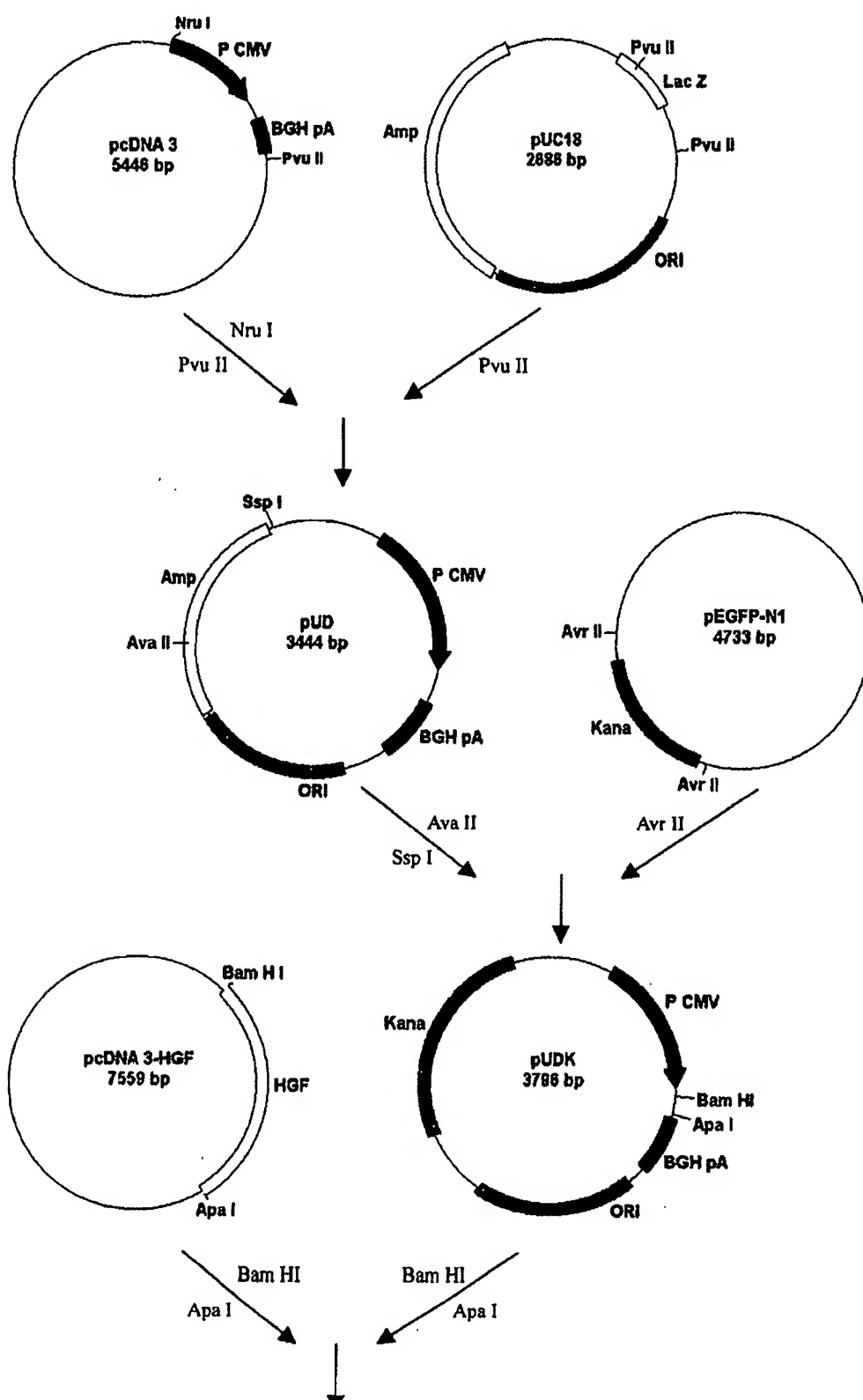




图 2

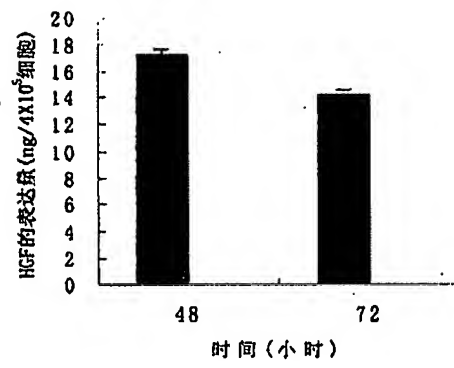
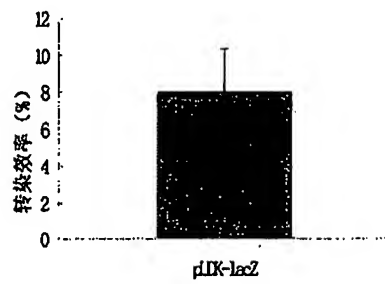


图 3



(a)



(b)

图 4

00-10-21

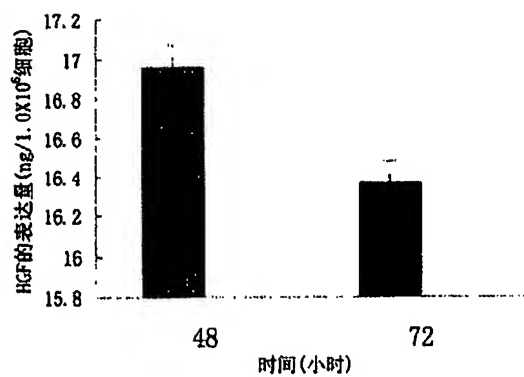
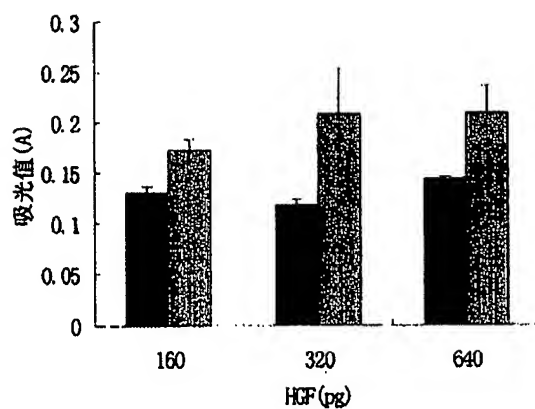
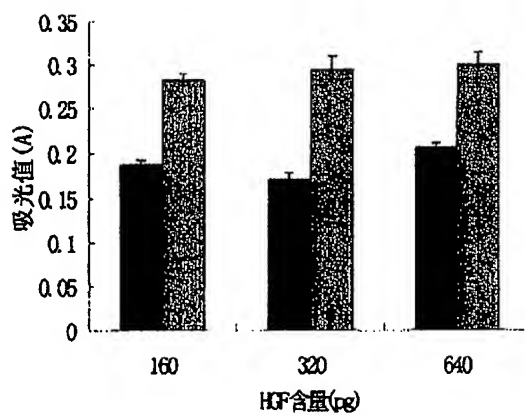


图 5



(a)



(b)

图 6

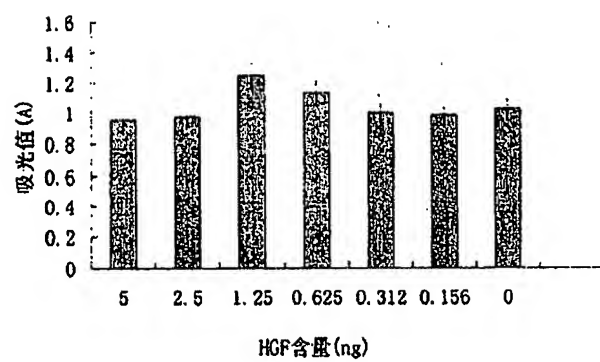


图 7



(a)转移组

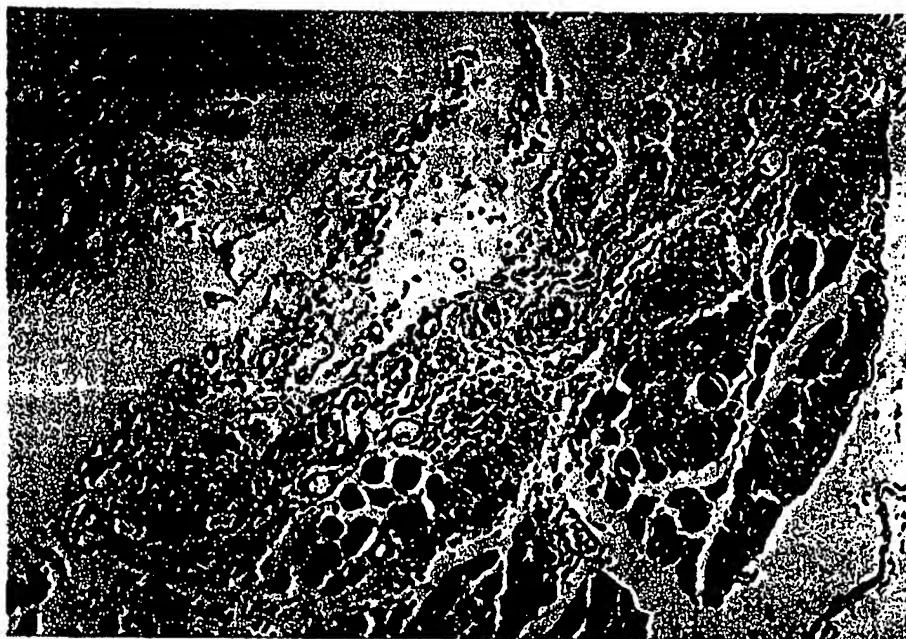


(b)未转移侧

图 8



(a)



(b)

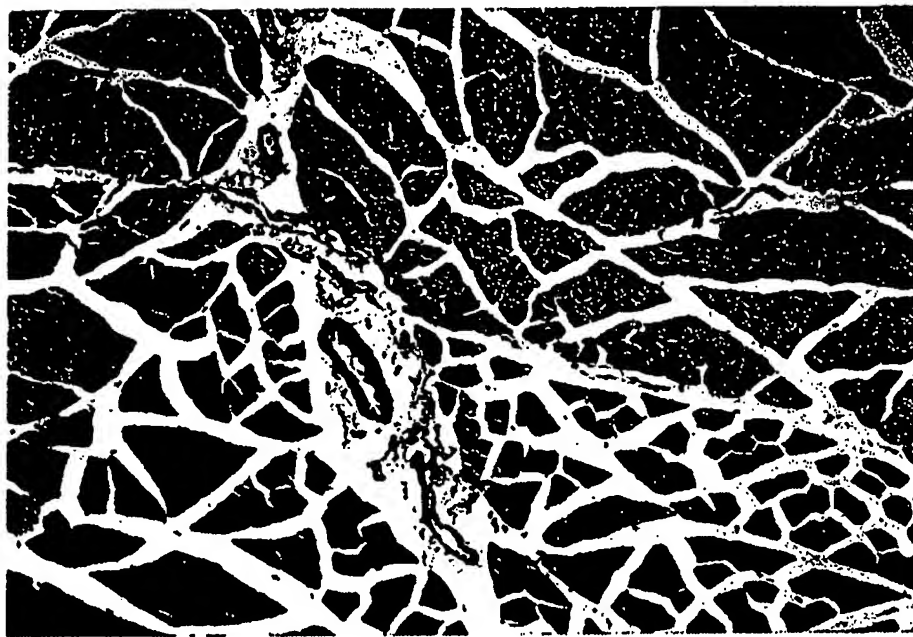


(c)

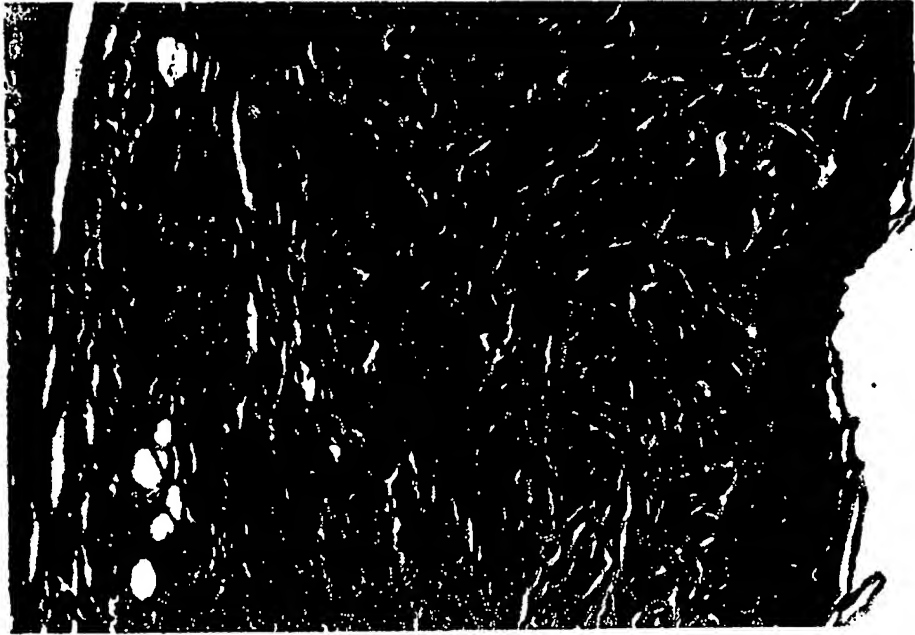


(d)

图 9



(a)



(b)

图 13